

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000214

International filing date: 26 January 2005 (26.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0005033
Filing date: 27 January 2004 (27.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

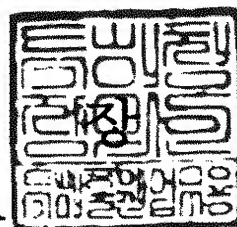
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0005033 호
Application Number 10-2004-0005033

출 원 년 월 일 : 2004년 01월 27일
Date of Application JAN 27, 2004

출 원 인 : 재단법인 목암생명공학연구소
Applicant(s) MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE

2005 년 2 월 9 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허 출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.01.27
【발명의 명칭】	형질전환 사카로마이세스 세레비지애 균주 및 이를 이용한 L K8 단백질의 생산방법
【발명의 영문명칭】	Transformed Saccharomyces cerevisiae and production method of LK8 protein using the same
【출원인】	
【명칭】	재단법인 목암생명공학연구소
【출원인 코드】	3-1998-006148-4
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인 코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-033454-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임형권
【성명의 영문표기】	LIM, Hyung-Kwon
【주민등록번호】	670914-1108519
【우편번호】	463-050
【주소】	경기도 성남시 분당구 서현동 효자촌 대우아파트 621-401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박정환
【성명의 영문표기】	PARK, Jung Hwan
【주민등록번호】	701109-1835518
【우편번호】	133-809
【주소】	서울특별시 성동구 금호동4가 1145번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성근
【성명의 영문표기】	KIM, Sung-Geun

【주민등록번호】	710317-1221519
【우편번호】	442-190
【주소】	경기도 수원시 팔달구 우만동 300번지 주공아파트 401동 1004호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	우성환
【성명의 영문표기】	WOO,Sung Hwan
【주민등록번호】	731202-1063611
【우편번호】	442-727
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 신나무실주공5단지 514동 903호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김명동
【성명의 영문표기】	KIM,Myung-Dong
【주민등록번호】	710117-1813216
【우편번호】	157-905
【주소】	서울특별시 강서구 화곡2동 863-1 3층
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	차광현
【성명의 영문표기】	CHA,Kwang-Hyun
【주민등록번호】	790529-1273611
【우편번호】	210-939
【주소】	강원도 강릉시 포남2동 1202-1
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이태희
【성명의 영문표기】	LEE,Tae-Hee
【주민등록번호】	750414-1069018
【우편번호】	411-330

【주소】	경기도 고양시 일산구 풍동 1127-1번지 쌍용스윗닷홈 107동1001호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서진호
【성명의 영문표기】	SEO, Jin-Ho
【주민등록번호】	531224-1000829
【우편번호】	137-060
【주소】	서울특별시 서초구 방배동 방배멤피스 현대아파트 101-903
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정경환
【성명의 영문표기】	JUNG, Kyung-Hwan
【주민등록번호】	580725-1024211
【우편번호】	138-737
【주소】	서울특별시 송파구 오금동 2 대림APT 2동 807호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박두홍
【성명의 영문표기】	PARK, Doo-Hong
【주민등록번호】	561115-1024814
【우편번호】	137-062
【주소】	서울특별시 서초구 방배동 2754-3
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10582BP
【수탁일자】	2004.01.13
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	2
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 44 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권 주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 13 항 525,000 원

【합계】 563,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면 후 수수료】 281,500 원

【첨부서류】 1. 미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신생혈관생성 저해제인 LK8 단백질의 생산방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 LK8 발현카세트를 포함하는 재조합 발현벡터, 이를 도입한 형질전환 효모 균주 및 상기 형질전환 효모 균주를 이용한 LK8 단백질의 생산방법에 관한 것이다. LK8 단백질은 신생혈관생성 억제 기능을 갖고 있으므로, 본 발명의 LK8 단백질의 생산방법은 상기 단백질의 항암제 등의 신생혈관 생성과 관련된 질환의 치료제로의 상용화에 크게 기여할 수 있다.

【대표도】

도 4

【색인어】

LK8, 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)

【명세서】

【발명의 명칭】

형질전환 사카로마이세스 세레비지에 균주 및 이를 이용한 LK8 단백질의 생산방법 {Transformed *Saccharomyces cerevisiae* and production method of LK8 protein using the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 pMBRI-LK8 발현벡터에 *EcoRI* 및 *BamHI* 제한효소를 처리하여 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호 (MAT α) (α -factor secretion signal)와 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA를 가진 DNA 절편 (500 bp) 및 GAL1 프로모터의 DNA 절편 (6.4 kbp)을 확인한 아가로스 겔 전기영동 사진이다.

도 2는 효모에서 재조합 LK8 단백질을 생산하기 위해 이용할 수 있는 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호 (MAT α)와 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA를 가진 DNA 절편을 p426GAL1 벡터의 GAL1 프로모터와 CYC1 터미네이터 사이에 삽입된 발현 벡터 pMCLK8 (6.9 kb)의 개열지도이다.

도 3a는 재조합 LK8 단백질 생산에 있어 최적균주를 선별하기 위해 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) BJ3501, BY4742, CEN.PK2-1D 및 2805 균주의 회분식 배양 후, 액체크로마토그래피 (liquid chromatography)를 수행하여 LK8 단백질의 생산과 당 분석을 확인한 그래프이다.

도 3b는 상기 도 3a의 각 균주에서 생산된 LK8 단백질의 양을 30시간, 40시간 이 경과된 후 이뮤노블롯팅 (immunoblotting)을 통해 확인한 전기영동 사진이다.

도 4는 GAL1 프로모터, 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호, 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA 및 CYC1 터미네이터를 포함하는 LK8 발현 카세트를 효모의 염색체 내로 삽입시키기 위해 제조한 재조합벡터 M8 LK8의 개열지도이다.

도 5는 LK8 발현 카세트를 효모의 염색체 내로 삽입시킨 형질전환 효모 균주 중 G418 설페이트 (sulfate) 항생제에 강한 내성을 가지는 균주를 선별하기 위해 콜로니 블라팅 (colony blotting)을 하고, 검색용액을 첨가하여 발광시킨 필름에 고정한 후, 필름에 나타난 점적의 음영 정도를 살펴본 1차 균주 스크리닝 사진이다.

A : 5 g/l 의 G418 설페이트 처리,

B : 10 g/l 의 G418 설페이트 처리,

C : 15 g/l 의 G418 설페이트 처리,

도 6은 상기 도 5의 상기 1차 균주 스크리닝에 의해 선별된 균주를 니트로셀룰로즈막 위에 닷 블랏 키트 (Dot blot kit)를 이용하여 점적한 후, 검색키트를 사용하여 필름에 나타난 점적의 음영 정도를 살펴본 2차 균주 스크리닝 사진이다.

도 7은 형질전환 효모균주 사카로마이세스 세레비지에 BJ3501//M8 LK8 #36의 발효공정 중 시간에 따른 균체의 성장 (●), 갈락토스 투입 축적량 (▼) 및 잔류 갈락토스 양 (■)을 나타낸 그래프이다.

도 8은 형질전환 효모 균주 사카로마이세스 세레비지에 BJ3501//M8 LK8 #36의 발효공정 중 채취한 배양액 내 LK8 단백질의 SDS-PAGE 전기영동 사진이다.

레인 1 : 래더마커, 레인 2 : 배양 38시간 경과 후,

레인 3 : 배양 86시간 경과 후, 레인 4 : 배양 110시간 경과 후,

레인 5 : 배양 134시간 경과 후, 레인 6 : 배양 158시간 경과 후,

레인 7 : 배양 184시간 경과 후, 레인 8 : 배양 211시간 경과 후,

레인 9 : 대조군으로서의 LK8 단백질 (200 mg/ℓ),

레인 10 : 대조군으로서의 LK8 단백질 (100 mg/ℓ),

도 9는 LK8 단백질의 분리, 정제 단계 중에서 양이온-교환을 통하여 상기 단백질이 정제되는 것을 나타내는 크로마토그램이다.

세척 (washing) : 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액,

용출 (elution) : 0.1 내지 1 M의 인산나트륨, 0 내지 2 M의 NaCl 용액,

클리닝 (cleaning) : 0 내지 2 M의 NaCl 용액,

도 10은 SP 세파로즈 (SP-Sepharose) 양이온-교환 크로마토그래피의 각 분획에 따른 LK8 단백질 농도를 나타내는 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 (PAGE) 사진이다.

레인 1 : 래더마커,

레인 2 : 최종배양액의 상층액,

레인 3 : 최종배양액 상층액을 5배 희석한 시료,

레인 4 : 희석된 시료가 수지에 붙지 않고 통과된 시료,

레인 5 : 수지를 세척한 시료,

레인 6 : 용출된 시료 분획 #1,

레인 7 : 용출된 시료 분획 #2,

레인 8 : 용출된 시료 분획 #3,

레인 9 : 용출된 시료 분획 #4,

레인 10 : NaOH로 용출된 시료,

도 11은 LK8 단백질의 분리, 정제 단계 중에서 소수성 결합 크로마토그래피에 의해 상기 단백질이 정제되는 것을 나타내는 크로마토그램이다.

세척 (washing) : 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액,

용출 (elution) : 0.1 내지 3 M의 암모늄 설페이트, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨, NaCl 용액,

클리닝 (cleaning) : NaCl 용액,

도 12는 SP 페닐세파로즈 6FF (SP-phenylsepharose 6 fast flow) 소수성 결합 크로마토그래피의 각 분획에 따른 LK8 단백질 농도를 나타내는 PAGE 사진이다.

레인 1 : 마커,

레인 2 : SP-세파로즈 양이온 교환 수지에서 용출된 시료,

레인 3 : 시료가 수지에 붙지 않고 통과된 시료,

레인 4 : 용출된 시료 분획 #1,

레인 5 : 용출된 시료 분획 #2,

레인 6 : 용출된 시료 분획 #3,

레인 7 : 인산나트륨 용액에 용출된 시료,

레인 8 : 증류수에 용출된 시료,

레인 9 : 래더마커,

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<48> 본 발명은 LK8 단백질의 생산방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 혈관생성 억제활성이 있는 LK8 단백질을 코딩하는 유전자로 형질전환된 사카로마이세스 세레비 지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용한 LK8 단백질의 생산방법에 관한 것이다.

<49> 신생혈관생성 (angiogenesis)은 조직이나 장기에 신규의 혈관을 제공하는 생물학적 과정으로, 구체적으로는 기존의 미세혈관으로부터 새로운 모세혈관이 생성되는 것으로 성장 후 체내에서 혈관이 생성되는 근본적인 과정이다. 인체에서 정상적으로 관찰되는 생리적 신생혈관생성은 태아 및 배아의 발달, 자궁의 성숙, 태반의 증식, 황체의 형성 및 상처의 치유와 같은 매우 제한된 상황에서만 일어나며, 이 시기에도 매우 엄격히 조절되어 필요한 기능이 달성되면 혈관신생은 중단된다. 신규한 혈관생성은 신생혈관생성 조절인자 (Folkman, J. (1995) *Nature Med.*, 1: 27-31)에 의해 엄격하게 조절되며, 신생혈관생성의 표현형은 신생혈관생성 자극인자의 상향조절 (up-regulation) 및 신생혈관생성 억제인자의 하향조절 (down-regulation) 사이의 전체적인 균형에 의하여 바뀐다고 보고되어 왔다.

<50> 신생혈관이 생성되는 과정은 매우 복잡하고 정교하나, 요약하면 다음과 같다.

첫째, 신생혈관생성을 위한 자극이 기존의 혈관에 전달되면 혈관이 팽대하고 막투과도가 증가한다. 둘째, 팽대된 혈관을 통하여 피브린(fibrin)이 혈관 밖으로 빠져나와 혈관 주위의 세포질 기질에 침적된다. 셋째, 기존 혈관의 기저막을 분해하기 위한 효소가 활성화되며, 넷째, 기저막이 파괴되어 그 사이로 내피세포가 혈관을 빠져나와 주위 세포의 기질에서 증식하고 이동한다. 마지막으로, 일렬로 배열한 내피세포들이 맥관을 이룸으로써 새로운 혈관을 생성하게 된다.

<51> 이러한 혈관신생과 관련이 있는 질환을 크게 분류해 보면 관절염과 같은 염증성 질환, 당뇨병성 망막증과 같은 안과 질환, 건선(psoriasis)과 같은 피부과 질환 및 가장 대표적인 질환인 암으로 나눌 수 있다(Folkman, J. (1995) *Nature Med.*, 1: 27-31). 특히, 원발성 종양과 전이성 종양은 그들의 성장을 위하여 신생혈관의 생성을 필요로 한다(Folkman, J. (1971) *New Engl. J. Med.*, 285: 1182-1186; Folkman, J. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 10931-10934). 따라서, 종양은 신생혈관생성 활성이 억제되거나 제거되면 성장할 수 없으므로, 종양의 신생혈관생성 저해가 상기 질환의 장기적인 치료에 효과적이라는 것을 제안하는 다수의 보고가 있다.

<52> 그러므로, 신생혈관생성을 억제하거나 제거할 수 있는 신규한 신생혈관생성 저해제의 개발이 요구될 뿐만 아니라, 상기 저해제의 효과적인 대량생산을 통하여 보다 저렴하게 일반 수요자에게 공급할 필요성이 있다.

<53>

특히, 암치료에 있어서 암세포에 직접적으로 작용하지 않고 종양에 영양분을 공급하는 혈관을 목표로 하는 혈관생성 억제제는 암세포의 약물 내성을 피할 수 있는 장점이 있어 현재 가장 유망한 항암치료 방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 종양에서 혈관생성을 억제하기 위해 생체내 자연 존재하는 억제제, 합성 억제제, 인테그린(integrin) 억제제, 신호전달 억제제, 그리고 단백질분해 억제제 등과 같은 수많은 물질들이 현재 효능을 검증받고 있고 임상시험 중에 있다(Brower, V. (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**: 963-8; Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) *Nature*, **407**: 249-57). 상기 임상시험 중인 신생혈관생성 저해제 중에서, 국제특허 공개번호 WO 01/19868A1(발명의 명칭: '신규한 신생혈관생성 저해제')로 출원된 사람 아포지질단백질(apolipoprotein) (a) 중 아포(apo) (a)의 구성 단위체인 36번째, 37번째 및 38번째 크링글(kringle) 단위체인 LK6, LK7 및 LK8 단백질은 각 단위체마다 상피세포 성장 및 이동에 대한 억제효능과 함께 신생혈관생성 저해의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 LK8 단백질의 경우 가장 강한 활성이 있는 것으로 입증되었다. 이러한 LK8 단백질의 효능 검사, 임상시험 실시 및 저렴화를 통한 상용화된 공급 등을 위해서는 LK8 유전자로 형질전환된 재조합 균주의 배양을 통한 대량생산 체계의 개발이 시급한 실정이다.

<54>

이에, 본 발명자들은 LK8 단백질의 기능 및 효과적인 실용화 방안을 연구하던 중, 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에 LK8 유전자를 도입하여 형질전환된 사카로마이세스 세레비지애를 제조하고, 이로부터 LK8 단백질을 대량으로 분비하는 균주를 선별한 후, 상기 제조된 균주의 적절한 배양조건을 확립하

여 고순도의 LK8 단백질을 대량생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<55> 본 발명의 목적은 신생혈관생성 저해제인 LK8 단백질을 대량 생산할 수 있는 형질전환 효모균주의 제조 및 상기 균주의 배양에 의한 LK8 단백질의 대량 생산방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<56> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 프로모터, 분비서열, 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA 및 터미네이터의 순서로 이루어진 LK8 발현 카세트를 포함하는 M 8 LK8 재조합 발현 벡터를 제공한다.

<57> 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 숙주 균주에 도입한 형질전환 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 제공한다.

<58> 또한, 본 발명은 (1) LK8 유전자 재조합 발현벡터를 숙주 균주에 도입하여 형질전환 균주를 제조하는 단계; (2) 단계 1의 형질전환 균주를 종배양한 뒤, 공기 공급량 및/또는 교반속도의 조절로 용존산소량을 일정하게 유지하고, 탄소원으로 포도당 및 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 회분배양하는 단계; (3) 단계 2의 배양액을 탄소원으로 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 유가배양하는 단계; 및 (4) 단계 3의 배

양액으로부터 LK8 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 LK8 단백질의 대량 생산방법을 제공한다.

<59> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<60> 본 발명은 프로모터, 분비서열, 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA 및 터미네이터 순서로 이루어진 LK8 발현 카세트, 숙주균주의 염색체에 LK8 발현 카세트를 다중으로 삽입하기 위한 δ 염기서열 및 다중삽입 후 선별을 위한 네오마이신 저항유전자(neo)를 포함하는 M δ LK8 재조합 발현 벡터를 제공한다. 이때, 프로모터는 GAL1 프로모터이고, 분비서열은 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호(α -factor secretion signal)이고, 터미네이터는 CYC1 터미네이터인 것이 바람직하다.

<61> 구체적으로, 본 발명자들이 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 효모균주에서 LK8 단백질을 생산하는데 이용하였던 pMBRI-LK8 발현벡터(대한민국 특허출원 제 2003-0006391호)에 제한효소를 처리하여 α -인자 분비신호와 LK8 cDNA를 가진 DNA 절편을 확보한 후(도 1 참조), 이를 p426GAL1 벡터에 삽입하여 효모에서 재조합 LK8 발현 카세트를 생산하기 위해 이용할 수 있는 발현벡터 pMCLK8(6.9 kb)(도 2 참조)을 제조한다. 이후, 프로모터, 분비서열, LK8 cDNA 염기서열, 터미네이터를 포함하는 재조합 LK8 발현 카세트를 효모의 염색체 내로 삽입시키기 위한 M δ LK8 재조합 발현 벡터(도 4 참조)를 제조하고, 이를 효모내의 염색체 내에 다량 삽입한다.

<62> 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터를 숙주 균주에 도입한 형질전환된 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 제공한다. 이때, 상기 숙주 균주는 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501, 사카로마이세스 세레비지애 BY4742, 사카로마이세스 세레비지애 CEN.PK2-1D, 사카로마이세스 세레비지애 2805로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501인 것이 더욱 바람직하다.

<63> 본 발명에서는 상기 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501를 이용하여 LK8 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환되어 LK8 유전자가 효모 염색체 내에 다량 도입된 형질전환 효모 균주를 선별한다. 이때, 콜로니 이뮤노블라팅 (colony immunoblotting), 닷 블라팅 (dot-blotting) 및 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assays) 의 스크리닝 과정 (도 5 및 도 6 참조)을 통해 LK8 단백질을 대량생산하는 균주를 선별하여 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501//M8 LK8 #36이라 명명하고, 이를 2004년 1월 13일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 10582BP) .

<64> 또한, 본 발명은 (1) LK8 유전자 재조합 발현벡터를 숙주 균주에 도입하여 형질 전환 균주를 제조하는 단계; (2) 단계 1의 형질전환 균주를 종배양한 뒤, 공기 공급량 및/또는 교반속도의 조절로 용존산소량을 일정하게 유지하고, 탄소원으로 포도당 및 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 회분배양하는 단계; (3) 단계 2의 배양액을 탄소원으로 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 유가배양하는 단계; 및 (4) 단계 3의 배

양액으로부터 LK8 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 LK8 단백질의 대량 생산방법을 제공한다.

<65> 본 발명의 단계 1은 LK8 유전자 재조합 발현벡터를 숙주 균주에 도입하여 형질 전환 균주를 제조하는 단계이다. 이때, 상기 형질전환 균주는 LK8 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현벡터를 숙주균주에 도입하여 선별된 형질전환 사카로마이세스 세레비지에 균주이다.

<66> 본 발명의 단계 2는 상기 단계 1의 형질전환 균주를 종배양한 뒤, 공기 공급량 및/또는 교반속도의 조절로 용존산소량을 일정하게 유지하고, 탄소원으로 포도당 및 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 회분배양하는 단계이다. 이때, 상기 단계 2의 종배양액은 5 ~ 10% (w/v) 농도로 접종한다. 본 발명의 회분배양은 1 ~ 3 vvm (5 내지 80 ℓ /분)의 공기 공급량 및/또는 200 내지 1000 rpm의 교반속도에서 최대용존산소량의 40 ~ 90%의 용존산소량을 유지하고, 탄소원으로 1 ~ 5% (w/v)의 포도당 및 1 ~ 5% (w/v)의 갈락토스를 포함하는 액체배지를 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 상기 액체배지는 추가적으로 1 ~ 50 g/ℓ의 효모추출물, 1 ~ 10 g/ℓ의 카사미노에씨드 (casamino acid), 0.1 ~ 5 g/ℓ의 우라실 (uracil) 및 0.1 ~ 5 g/ℓ의 히스티딘 (histidine)을 포함하는 것이 바람직하다.

<67> 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 본 발명의 형질전환 효모 균주를 일정한 멸균 보관용기에 수백개 내지 수천개 분주한 후, 동일한 상태로 보관 관리하면서

제조합 단백질 생산시 종균으로서 종배양에 사용되도록 유지 관리하는 체계인 워킹셀
뱅크 시스템을 구축하고 LK8 분비를 위한 발효 공정을 개발하였다.

<68> 워킹셀뱅크로부터 24시간 동안 적절한 균체량과 활성도를 얻어낼 수 있도록 종
배양한다. 본 발명의 회분배양단계는 세포성장 단계로서 발현 및 분비에 알맞은 세
포량이 될 때까지 세포를 양적으로 증대시키고 발현유도 물질로 사용되는 갈락토스의
적응기간을 주는 과정이다. 회분배양 후반부에서는 균체들의 왕성한 호흡작용으로
인해 용존산소량이 감소되어 이를 방지하기 위해서 공기공급량 및 교반속도의 물리적
조건을 회분배양 종료시까지 조절함으로써 용존산소량을 40% 이상으로 유지한다.

<69> 본 발명의 단계 3은 상기 단계 2의 배양액을 탄소원으로 갈락토스를 포함하는
액체배지에서 유가배양하는 단계이다. 이때, 유가배양은 최대 용존산소량의 20 ~
80%의 용존산소량을 유지하고, 탄소원으로 20 ~ 50% (w/v)의 갈락토스를 포함하는 액
체배지를 사용하는 것이 바람직하며, 배지내의 잔존 갈락토스 농도가 0.5 ~ 5 % (w/v)
가 되도록 액체배지의 공급속도를 조절하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 액체배지
는 추가적으로 1 ~ 50 g/ℓ의 효모추출물, 1 ~ 30 g/ℓ의 펩톤, 0.1 ~ 5 g/ℓ의 우
라실(uracil) 및 0.1 ~ 5 g/ℓ의 히스티딘(histidine)을 포함하는 것이 바람직하다.

<70> 구체적으로, 본 발명에서는 유가배양단계의 초기부터 배지내 갈락토스의 잔존농
도를 일정범위내로 유지하는 방식으로 갈락토스를 공급한다. 즉, 상기 갈락토스 공
급 방식은 용존산소량을 주시하며 적절한 값으로 갈락토스를 첨가함과 동시에 잔존
갈락토스의 양을 5% (w/v) 이하로 유지하면서 LK8 단백질의 발현을 증가시킨다. 상기

유가배양 과정을 통하여 배양 상등액 1 ℓ 당 수 백 mg 이상의 LK8 단백질을 수득할 수 있다 (도 7 및 도 8 참조).

<71>

본 발명의 단계 4는 상기 단계 3의 배양액으로부터 LK8 단백질을 정제하는 단계이다. LK8 단백질은 분자량 9-10 kD의 친수성 (hydrophilic) 분자로서 중성 pH에서 용해도가 낮은 특징이 있고, 배양액에 발현되는 과정에서 원래의 LK8의 분자량보다 작거나, 큰 유도체들이 생성되기도 한다. 따라서, 배양액 내에서 LK8 단백질을 순수 분리하기 위해서는 LK8의 물리화학적 성질을 이용하여 배양액으로부터 LK8 단백질을 분리시키는 정제 공정의 개발이 필요하다.

<72>

본 발명의 LK8 단백질의 정제는 단백질 정제과정에 해당하는 것이라면 특별히 제한되지는 아니하나, 크로마토그래피 방법으로 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 크로마토그래피 방법은 이온교환 크로마토그래피 및 소수성 결합 크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography) 방법을 포함하는 것이 더욱 바람직하다 (도 9 내지 도 12 참조). 이때, 상기 이온교환 크로마토그래피는 양이온교환 크로마토그래피이고, pH 4.0 ~ 8.0, 0 ~ 5 M의 NaCl를 포함하는 용출액으로 LK8 단백질을 용출시키는 것이 바람직하다. 또한, 상기 소수성 결합 크로마토그래피는 0.1 ~ 5 M의 암모늄설페이트 (ammonium sulfate) 및 0 ~ 500 mM의 NaCl을 포함하는 pH 4 ~ 8, 0 ~ 100 mM의 인산나트륨 용출액으로 LK8 단백질을 용출시키는 것이 바람직하다.

<73>

구체적으로, 본 발명은 양이온교환 크로마토그래피를 이용하여 LK8 단백질을 양이온 교환수지에 붙인 후, pH 또는 염 농도를 조절하여 불순물을 제거하고 적정 단백질 농도의 LK8이 용출되도록 유도한다. 이때, 사용된 pH와 염농도는 이용되는 양이

온 교환수지의 종류에 따라 다르다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 SP(sulpho propyl)의 강 이온교환수지를 이용하였으나, 일반적으로 강 양이온 교환수지 크로마토그래피(strong ion exchange chromatography)가 약 양이온 교환수지 크로마토그래피(weak ion exchange chromatography)보다 이온결합이 강하므로, 비교적 높은 농도의 염과 pH 조건을 사용하여 세척과 LK8 용출이 진행되도록 하는 것은 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 쉽게 응용할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 범위는 실시예에서 사용한 SP(sulpho propyl) 양이온 교환수지와 버퍼조건에만 한정되는 것이 아니고, 실질적으로는 통상의 양이온 교환수지를 이용하여 LK8로부터 불순물을 제거하고 LK8을 농축시키는 정제공정을 포함한다.

<74>

또한, 상기 양이온 교환수지로 정제된 시료는 소수성 결합 크로마토그래피 방법을 이용하여 친수성 LK8 단백질을 높은 염농도로 소수성 수지(resin)에 결합시켜 불순물을 보다 낮은 염농도에서 제거하고 적정 염농도에서 LK8을 용출한다. 또한 강한 소수성 불순물은 용출 적정 염농도 이하에서 제거된다. 일반적인 소수성 단백질을 정제할 때 소수성 결합 크로마토그래피 방법을 사용하지만 양이온 교환수지로 제거되지 않는 불순물은 상기와 같이 소수성의 특징을 이용하여 제거하는 것은 통상의 정제 과정으로 볼 수 있다. 이를 통해 정제된 LK8 단백질을 대량 생산할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범위는 상기 소수성 결합 수지와 버퍼조건에만 한정되는 것이 아니고, 실질적으로는 통상의 소수성 결합 수지를 이용하여 LK8로부터 불순물을 제거하는 정제공정을 포함한다.

<75>

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<76> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<77> <실시예 1> 재조합 LK8 발현벡터의 제조와 발현

<78> 인간 아포리포단백질 (apolipoprotein) 크링글 (kringle) 영역 V38의 아미노산 서열로 구성된 LK8 cDNA를 포함하는 유전자를 효모 내에서 발현시키기 위한 발현벡터를 제조하였다.

<79> 구체적으로, α -인자 분비신호 (α -factor secretion signal)와 LK8 cDNA를 함께 분리하기 위해 본 발명자들이 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)에서 재조합 LK8을 생산하는데 이용하였던 pMBRI-LK8 발현벡터 (대한민국 특허출원 제2003-0006391호)를 이용하였다. 상기 pMBRI-LK8 발현벡터는 기본벡터로 인비트로젠 (Invitrogen, Netherland)사에서 구입한 pPIC9 벡터 (8.0 kb)를 이용하였다. 즉, pPIC9 발현벡터의 AOX1 프로모터를 이용하여 메탄올에 의해서 LK8 유전자의 발현이 유도되고, 또한 α -인자 분비신호 (α -factor secretion signal) 바로 뒤에 목적단백질의 유전자인 LK8 cDNA를 결합시켜서 발현된 LK8 단백질이 세포 밖으로 효과적으로 분비될 수 있도록 하였다. 이를 위하여 pET15b/LK8 (PCT/KR99/00554 참조)을 주형 (template)으로 PCR 방법에 의해 LK8 유전자를 대량증폭하고, 이를 제한효소 *Xho*I과 *Eco*RI으로 절단한 후, pPIC9 벡터에 삽입하는 서브클로닝 (subcloning)을 수행하여, LK8 유전자의 최종 발현벡터인 pMBRI-LK8 (8.25 kb)을 제조하였다.

<80> 이후, 상기 pMBRI-LK8 발현벡터에 *EcoRI* 제한효소를 7시간 동안 처리한 후, PCR 정제키트 (Purification Kit) (QIAGEN)를 이용하여 세척하였다. 이후, *BamHI* 제한효소를 7시간 동안 처리한 후, 전기영동을 통해 DNA를 분리하고 겔 추출 키트 (Gel Extraction Kit) (QIAGEN)를 이용하여 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호와 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA 염기서열을 가진 DNA 절편을 수득하였다(도 1). 상기 수득한 DNA 절편을 p426GAL1 (ATCC 87833, USA) 벡터의 GAL1 프로모터와 CYC1 터미네이터 사이에 삽입하여 효모에서 재조합 LK8을 생산하기 위해 이용할 수 있는 발현 벡터 pMCLK8 (6.9 kb)을 제조하였다(도 2). 상기 발현벡터는 GAL1 프로모터를 가지고 있어 갈락토스(galactose)에 의해 단백질 발현이 유도된다. 효모의 형질전환 후 선택배지에서의 선별을 위해 URA3 마커를 이용하였다.

<81> <실시예 2> LK8 단백질의 발현을 위한 숙주 균주의 선별

<82> LK8 단백질의 발현을 위한 최적 숙주균주를 선별하기 위해 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 중에서 BJ3501 (ATCC 208280, USA), BY4742 (EUROSCARF Y10000, GERMANY), CEN.PK2-1D (EUROSCARF 30000B, GERMANY) 및 2805 (Sohn, J.H. (1991) *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1: 266-273)를 대상으로 실험을 진행하였다.

<83> 구체적으로, 알칼리 카타이온 효모 키트 (Alkali Cation Yeast Kit) (Q-BIO gene 사)를 이용하여 상기 각 균주를 실시예 1에서 제조한 발현벡터로 형질전환시켰다. 형질전환 여부를 확인하기 위해 우라실이 결여되어 있는 효모 질소 염기 배지 (yeast

nitrogen base without amino acid 0.67%(Difco, USA), Yeast synthetic drop-out medium supplement without uracil 0.192%(Difco, USA))에서 배양하였다. 재조합 LK8을 생산하기 위해 각 균주들을 30℃, pH 5.5에서 700 rpm의 속도로 교반하여 생물 반응기 (Biostat Q, B. Braun)에서 배양하였고, 이때 YPDG 배지 (2% 펩톤, 1% 효모추출물, 2% 글루코스, 3% 갈락토스)를 이용하였다. 발효과정 동안 4시간 간격으로 배양액을 회수하였고, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 분리된 LK8 단백질이 포함되어 있는 상등액 만을 따로 수집하였다. 수득한 LK8 단백질을 액체 크로마토그래피 (liquid chromatography)를 사용하여 당 분석을 수행하고 (도 3a), 이뮤노블롯팅 (immunoblotting) 방법을 통하여 분리된 재조합 LK8 단백질의 양을 확인하였다 (도 3b).

<84> 그 결과, 각 형질전환된 균주 모두에서 LK8 단백질이 분리됨으로써 pMCLK8 발현 벡터가 효율적으로 도입되었음을 확인할 수 있었고, 그 중에서도 단위세포 당 LK8 단백질의 분비량이 가장 높은 최적 균주는 사카로마이세스 세레비지에 BJ3501 임을 확인하였다.

<85> <실시예 3> LK8 발현카세트를 효모 염색체 내로 삽입시키기 위한 벡터의 제조 및 형질전환 효모균주의 선별

<86> GAL1 프로모터, α -인자 분비신호 (α -factor secretion signal), LK8 cDNA 염기서열 및 CYC1 터미네이터를 포함하는 LK8 발현 카세트를 효모의 염색체 내로 삽입시키기 위한 재조합벡터를 제조하고, 상기 벡터로 형질전환된 효모균주를 수득하였다.

<87>

구체적으로, 효모의 염색체에 존재하는 전이요소 중에 하나인 δ 서열 내에 원하는 유전자를 삽입할 수 있는 p δ neo 벡터 (Lee, FWF. (1997) *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**: 339)를 모벡터로 이용하였다. 즉, 상기 p δ neo 벡터에는 상동재조합 (homologous recombination) 방법으로 벡터를 다중삽입하기 위한 δ 서열 및 삽입된 벡터의 선별을 위한 네오마이신 저항 유전자 (neo)를 포함한다. 이때, LK8 발현카세트와 p δ neo 벡터의 서열내에는 모두 *Sa*I 제한효소 인식부위가 존재하는바, 재조합 벡터에 존재하는 *Sa*I 제한효소 인식부위는 효모 염색체로의 삽입을 위해 필수적으로 필요하기 때문에 DNA 블런트 키트 (DNA Blunt Kit) (Takara 사)를 이용하여 LK8 발현카세트에 존재하는 *Sa*I 제한효소 인식부위를 제거하였다. 한편, 상기 실시예 1에서 제조한 pMCLK8 벡터에서 GAL1 프로모터와 CYC1 터미네이터 양끝을 각각 절단하는 *Sac*I 및 *Kpn*I 제한효소를 이용하여 LK8 발현카세트를 분리하였다. 이때, p δ neo 벡터에는 *Kpn*I 제한효소 인식부위가 존재하지 않기 때문에 DNA 블런트 키트를 사용하여 p δ neo 벡터의 *Xba*I 제한효소 인식부위와 분리된 LK8 발현카세트의 *Kpn*I 제한효소 인식부위를 모두 블런트 말단 (blunt end)으로 만들었다. 이후, 상기 LK8 발현카세트를 상기와 같이 재조합된 p δ neo 벡터에 도입한 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 M δ LK8 재조합 발현벡터라고 명명하였다 (도 4).

<88>

이후, 알칼리 카타이온 효모 키트 (Q-BIO gene 사)를 이용하여 상기 제조된 M δ LK8 재조합 발현벡터로 효모를 형질전환시켰다. 이때, LK8 발현카세트가 효모 염색체 내에 다량으로 삽입되도록 하기 위해, 재조합 발현벡터 DNA의 농도를 3 μ g/ μ l로 농축하여 형질전환에 사용하였다.

<89> 본 발명의 M8 LK8 재조합 발현벡터로 형질전환된 효모를 G418 설페이트 (sulfate) 항생제가 함유된 YPD 플레이트 (2% 펩톤, 1% 효모 추출물, 2% 글루코스, 2% 아가)를 사용하여 선별하였다. 이때, G418 설페이트 항생제의 농도를 각각 5 g/ℓ, 10 g/ℓ 및 15 g/ℓ 로 조정하여 상기 형질전환 효모균주를 배양하였다.

<90> 그 결과, LK8 발현카세트가 효모의 염색체에 다량으로 삽입될 경우, 높은 농도의 G418 설페이트 항생제 배지에서도 성장할 수 있었고, LK8 활성도 높게 나타났다 (도 5). 따라서, LK8 유전자가 효모 염색체 내에 다량 도입되어 15 g/ℓ 이상의 G418 설페이트 항생제에 내성을 갖는 형질전환 효모 균주를 수만 콜로니 확보하였다.

<91> <실시에 4> 콜로니 이뮤노블라팅 (Colony immunoblotting)을 이용한 1차 균주 스크리닝 (Screening)

<92> 상기 실시예 3에서 선별한 형질전환 효모 균주를 콜로니 이뮤노블라팅을 통하여 LK8 단백질을 다량 발현하는 균주를 1차로 선별하였다.

<93> 구체적으로, YPD 고체배지에 상기 형질전환 사카로마이세스 세레비지에 균주를 도말하여 30℃, 24시간 동안 배양한 후, 콜로니 생성을 확인하였다. 멸균된 셀룰로스막 (cellulose membrane)을 상기 콜로니 위에 놓은 후, 주의깊게 셀룰로스막을 콜로니 위에서 떼어냈다. 한편, YPG 고체배지 위에 니트로셀룰로스막 (nitro cellulose membrane)을 올려놓은 후, 그 위에 상기 셀룰로스막을 콜로니가 붙은 쪽이 위로 가도록 하면서 기포가 생기지 않도록 주의하여 올려놓았다. 이후, 콜로니가 있는 고체배

지를 30℃, 48시간 동안 배양한 후, 셀룰로즈막을 조심하여 떼어내어 새로운 YPD 고체배지 위에 놓았다. 남겨진 니트로셀룰로즈막은 떼어낸 후, 블라팅에 이용하였다.

<94>

이때, 블라팅은 0.1%(v/v)의 트윈 20(Tween 20)이 첨가된 PBS 완충액과 5%(w/v)의 무지방 분유가 첨가된 용액에 니트로셀룰로즈막을 넣고, 상온에서 두시간 동안 약하게 교반하였다. 이후, 상기와 동일한 용액에 토끼 LK8 항체(Rabbit LK8 Ab)를 넣고, 한시간 동안 상온에서 약하게 교반한 후, 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충액으로 5번 반복하여 세척하였다. 항토끼 IgG-HRP(Anti rabbit IgG-horseradish peroxidase)(Sigma, USA)를 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충액 및 5%의 무지방 분유가 첨가된 용액에 넣은 뒤, 상기 처리된 니트로셀룰로즈막을 넣고 한시간 동안 상온에서 약하게 교반하였다. 이후, 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충액으로 5회 반복하여 세척한 후, 상기 니트로셀룰로즈막을 꺼내어 검색키트(SuperSignal West Pico kit)(Pierce, USA)에 검색용액(Pierce)을 첨가하여 발광시킨 필름에 고정한 후, 필름에 나타난 점적의 음영 정도를 관찰하였다.

<95>

그 결과, LK8 발현량에 따라 점적의 음영정도의 차이가 나타났으며(도 5), 상기 점적 중에서 강한 음영을 가진 점적을 나타내는 균주들을 1차 선별하였다.

<96>

<실시에 5> 닷 블라팅(Dot blotting)을 이용한 2차 균주 스크리닝(Screening)

<97>

상기 실시예 4의 1차 콜로니 스크리닝에서 선별된 균주를 대상으로 닷 블라팅으로 LK8 단백질을 보다 더 많이 발현하는 균주를 2차 선별하였다.

<98>

구체적으로, **실시예 4**에서 1차 선별된 형질전환 균주들을 YPG 액체배지가 있는 테스트 튜브에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 180 rpm으로 교반하여 배양하였다. 48시간 경과 후, 배양액을 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 이를 PBS로 10배 희석하여 니트로셀룰로즈막 위에 닷 블랏 키트(Dot blot kit) (Bio-Rad, USA)를 이용하여 점적하였다. 점적한 니트로셀룰로즈막을 0.5% (v/v)의 글루타르알데히드 (glutaraldehyde) 용액에 5분 내지 10분간 둔 후, 다시 50 mM의 글리신 (glycin) 용액에 넣은 뒤, PBS 완충액으로 세척하였다. 이후, 상기 니트로셀룰로즈막을 **실시예 4**에서 수행한 과정과 동일하게 검색키트를 사용하여 필름에 나타난 점적의 음영 정도를 관찰하였다.

<99>

그 결과, LK8 발현량에 따라 점적의 음영정도의 차이가 나타났으며 (도 6), 상기 점적 중에서 강한 음영을 가진 점적을 나타내는 균주들을 2차 선별하였다.

<100> <실시예 6> ELISA를 이용한 3차 균주 스크리닝 (Screening)

<101>

상기 **실시예 5**의 2차 스크리닝에서 선별된 균주를 대상으로 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay)를 하여 LK8 단백질을 많이 발현하는 최종 균주를 3차 선별하였다.

<102>

구체적으로, 2차에서 선택된 균주를 YPD 액체배지가 있는 테스트 튜브에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 180 rpm으로 교반하여 배양하였다. 그 후, 상기 배양액을 50 ㎖의 YPG 액체배지가 있는 플라스크에 접종한 후, YPG 액체배지로 OD를 맞추고 플

라스크당 최종 50 ml로 용량을 맞추었다. 이후, 30℃에서 48시간 동안 180 rpm으로 교반하여 배양한 후, 상기 배양액을 원심분리하여 상등액 만을 취하였다.

<103> ELISA를 위해 맥시솅(Maxisorp) 면역반응모듈(Immunomodule)에 0.25 μg/웰(well) 씩 토끼 LK8 항체(Rabbit LK8 Ab)를 코팅버퍼(0.1 M의 소듐 카보네이트(sodium carbonate), pH 9.6 버퍼)로 코팅하였다. 코팅된 면역반응모듈에 1%의 BSA(bovine serum albumin)와 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충용액을 처리하여 실온에서 2시간 정도 두었다. 이후, 상기 분리된 상등액을 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충용액으로 1000배 희석한 후, 준비해 둔 면역반응모듈에 넣고 37℃에서 1시간 정도 반응시켰다. 이후, 상기 면역반응모듈을 1%의 BSA와 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충용액으로 세척하였다.

<104> 한편, 1%의 BSA와 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충용액에 쥐 LK8 항체(Rat LK8 Ab)를 희석한 후, 상기 용액을 면역반응모듈에 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이후, 상기 면역반응모듈을 1%의 BSA와 0.1%의 트윈 20이 첨가된 PBS 완충용액으로 세척하였다.

<105> 모든 반응은 면역반응모듈에 TMB 발색시약(TMB Peroxidase Substrates)(KPL, USA)으로 15분간 발색시킨 후, 1 M의 인산용액으로 발색반응을 정지시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 발색정도로 LK8 단백질의 발현량을 확인하였다.

<106> 【표 1】

표준곡선을 이용한 LK8 단백질의 발현량

샘플군주	1	102	112	11	17	25	B9	B11	B12	B31	B36	B55
μg/ml	113	97	90	57	80	104	63	63	59	103	129	15

<107> LK8 발현량을 표준곡선 (standard curve)을 이용하여 정량화하였으며 (표 1), 최종적으로 최고의 LK8 단백질의 분비량을 나타내는 균주는 B36이었고, 이를 사카로마 이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*) BJ3501//M δ LK8 #36이라 명명하고, 2004년 1월 13일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 10582BP) .

<108> 상기 균주의 재조합 LK8 cDNA의 복제수를 확인하기 위해 서던 혼성화 (southern hybridization) 반응을 수행하였다. 그 결과, 약 8 카피 (copy)의 LK8 유전자가 삽입 되어 있음을 확인하였다.

<109> <실시예 7> 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501//M δ LK8 #36의 종배양, 회분배양 및 유가배양 방법

<110> <7-1> 종균배양

<111> 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501//M δ LK8 #36 형질전환 균주를 일정한 멸균 보관 용기에 수 백개 내지 수 천개 분주한 후, 동일한 상태로 보관 관리 하면서 재조합 단백질 생산시 종균으로서 종배양에 사용되도록 유지 관리하는 체계 (본 발명자들은 이를 '워킹셀뱅크 시스템'이라 함)를 구축하였다. 상기 형질전환 균 주를 종균으로 사용하여 24시간 동안 적절한 균체량과 활성도 (20배로 희석시켰을 때, OD 600 nm = 0.8 내지 1.2)를 얻어낼 수 있도록 YPD (1%의 효모 추출물, 2%의 펩톤, 2%의 글루코스 포함) 배지에서 종균배양하였다.

<112> <7-2> 회분배양

<113> 상기 YPD 배지에서 종균배양을 수행한 후, 초기 시작배지에 상기 실시예 <7-1>에서 수득한 종배양액을 접종하여 회분배양을 수행하였다. 본 발명의 회분배양 및 유가배양 단계는 세포성장 단계로서, 먼저 회분배양 단계는 세포성장 및 LK8 발현 유도 물질로 사용되는 갈락토스의 적응 단계로서, 종배양액을 1% 이상 접종하고, 탄소원으로 포도당 및 갈락토스를 사용하여 세포를 양적으로 증대시키면서 갈락토스 적응기간을 주었다. 이때, 사용된 초기 배양배지는 포도당 1 ~ 5% (w/v), 갈락토스 1 ~ 5% (w/v), 효모추출물 1 ~ 50 g/ℓ, 카사미노에씨드 (casamino acid) 1 ~ 10 g/ℓ, 우라실 0.1 ~ 5 g/ℓ, 히스티딘 0.1 ~ 5 g/ℓ 으로 구성된다.

<114> 회분배양 단계 후반부에서 균체들의 왕성한 호흡작용으로 인해 용존산소량이 급격히 고갈되어 일반적으로 순산소를 공급하는 방법을 사용하나, 본 발명에서는 상기 배지조성에 따라 1 내지 3 vvm의 공기공급량, 200 내지 1000 rpm의 교반속도인 물리적 조건을 조절하는 것을 회분배양 단계 후반부에서부터 배양 종료시까지 적용함으로써 용존산소량을 40% 이상으로 유지할 수 있었다. 이로 인하여 대규모 발효조에서 순산소를 사용하지 않고도 용존산소값을 일정수준 이상으로 유지하여 생산비용을 감소시킬 수 있었다.

<115> 그 결과, 균체량은 흡광광도량 (600 nm) 30 이상을 얻을 수 있었다.

<116> <7-3> 유가배양

<117> 유가배양단계는 발현 유도물질이면서 세포의 유일한 탄소원으로서 사용되는 갈락토스를 첨가하여 유가배양시켜 발효물질을 수득하는 단계이다.

<118> 구체적으로, 갈락토스 20 ~ 50%(w/v), 효모추출물 1 ~ 50 g/ℓ, 펩톤 1 ~ 30 g/ℓ, 우라실 0.1 ~ 5 g/ℓ 및 히스티딘 0.1 ~ 5 g/ℓ 로 구성된 배지를 사용하였다. 이때, LK8 단백질의 대량 분비를 유도하기 위해 갈락토스를 1 ml/hr 에서 30 ml/hr의 속도로 공급함으로써 배지내에 잔존하는 갈락토스의 양이 5%(w/v) 이하로 유지시켰다.

<119> 상기 갈락토스 공급 방식은 배양액 내 잔존 갈락토스의 농도를 측정하여 이를 기준으로 적절한 값으로 갈락토스를 첨가함으로써 잔존 갈락토스의 양을 적절한 값으로 유지시키는 방식을 사용하였다. 상기 갈락토스의 첨가 속도를 조절하여 발효기간 중 발효조내에 잔존하는 갈락토스 농도를 5 % (w/v) 이하 수준으로 유지하면서 LK8의 발현 및 분비를 지속적으로 증가시킬 수 있었다. 상기 유가배양 과정을 통하여 분비된 LK8 단백질은 발효 300시간 동안 배양 상등액 1 ℓ 당 수 백 mg 이상을 얻을 수 있었다.

<120> <실시예 8> 크로마토그래피에 의한 LK8 단백질의 정제

<121> LK8 단백질은 분자량 9 내지 10 kDa의 친수성 (hydrophilic)이 강한 분자로서 중성 pH 또는 유기용매에는 용해도가 낮은 특징이 있다. 또한, 배양액에 LK8 유전자가 발현되는 과정에서 정확한 LK8 단백질의 분자량보다 작거나 큰 유도체들이 발견되었으며, 이들은 LK8 단백질의 C-말단 또는 N-말단 부위의 아미노산이 잘리거나 혹은 화

학적인 유도체로 사료된다. 본 공정은 LK8 단백질의 이러한 물리화학적 성질과 배양상의 특징을 고려하여 고순도의 LK8 단백질을 생산하기 위하여, 양이온교환 크로마토그래피 및 소수성 결합 크로마토그래피 (Hydrophobic interaction chromatography)를 사용하는 정제 공정을 확립하였다. 즉, 양이온교환수지 크로마토그래피를 이용하여 pH와 염 농도를 조절하여 불순물을 제거하고 적절한 단백질 농도의 LK8 단백질이 용출되게 유도하였다. 그리고, 소수성 결합 크로마토그래피를 이용하여 친수성 (hydrophilic)이 강한 LK8 단백질이 고정상의 수지 (resin)에 높은 염농도를 이용하여 결합시켜 보다 낮은 염농도로 불순물을 제거하고 적정 염농도로 LK8 단백질을 용출한 후 소수성이 강한 불순물 즉, 소수성이 강한 단백질, 지질 또는 엔도톡신 (endotoxin) 등의 비단백질성 물질 (nonproteineous contaminant)을 더 낮은 염농도로 제거하였다. 상기의 크로마토그래피 정제 과정을 구체적으로 살펴보면 하기와 같다.

<122> <8-1> 양이온 수지 크로마토그래피에 의한 정제

<123> 실시예 7에서 수득한 배양액을 8,000 rpm 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상기 상등액을 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 (monobasic)으로 4배 희석하여 pH 4 이하로 조정 한 후, 0.45 μ m 필터막 (Filter membrane)으로 여과하였다. SP-세파로스 FF (SP-sepharose fast flow) 수지를 컬럼에 충전한 후, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액 (monobasic)으로 평형시켰다. 이후, 희석된 상등액을 SP-세파로스 컬럼에 로딩 하였다. 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액을 통과시켜 기저라인까지 이동시킨 후, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨을 pH 5 내지 7로 맞춘 용액으로 다시 세척하여 불순물을

제거하였다. 그 후, 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액을 흘려보내 LK8 단백질을 용출시켰다.

<124> 도 9의 크로마토그램과 도 10의 SDS-아크릴아마이드 겔 전기영동으로 확인된 바와 같이, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액의 세척으로 대부분의 불순물이 제거되었고, 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 인산나트륨 용액에 의한 용출 분획에서 LK8 단백질만이 용출되었다.

<125> <8-2> 소수성결합 크로마토그래피에 의한 정제

<126> SP-페닐세파로스 6FF (SP-phenylsepharose 6 fast flow) 수지를 컬럼에 충전시키고, 0.1 내지 3 M의 암모늄 설페이트 (ammonium sulfate)와 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액으로 평형시켰다. 상기 실시예 <8-1>에서 용출된 시료를 최종농도 0.1 내지 3 M이 되도록 암모늄 설페이트를 첨가하여 용해시킨 후 컬럼에 로딩하고, 0.1 내지 3 M의 암모늄 설페이트와 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액을 통과시켜 기저 라인까지 이동시켰다. 0.1 내지 3 M의 암모늄 설페이트와 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액으로 세척한 후, 0.1 내지 2 M의 암모늄 설페이트와 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액을 통과시켜 LK8 단백질을 용출시켰다. 용출된 LK8 단백질을 분자량 10,000 D 여과막 (Sigma, USA)으로 0.1 내지 1 M의 인산나트륨 용액을 이용해 투석 (dialysis) 하였다.

<127> 도 11의 크로마토그램과 도 12의 SDS-아크릴아마이드 겔 전기영동으로 확인한 바와 같이, 0 내지 2 M의 NaCl을 포함하는 pH 5 내지 9, 0.1 내지 1 M의 인산화나트륨 용액의 세척으로 대부분의 불순물이 제거되었고, 암모늄 설페이트 및 NaCl 용액에 의한 용출 분획에서는 LK8 단백질만이 용출되었다.

<128> 【표 2】

	LK8 (mg)	회수율 (%)
로딩	204.3	100
SP-세파로스 FF	160.6	80.1
SP-페닐세파로스 6FF	134.9	66

<129> 상기에서 살펴본 바와 같이, 실시예 7에서 수득한 균주배양액에서 LK8 단백질을 정제하는 데 있어서, 양이온 수지 크로마토그래피로 정제시 회수율은 80.1%였고, 소수성결합크로마토그래피로 정제시에 회수율은 66%임을 확인하였다(표 2).

【발명의 효과】

<130> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에 LK8 유전자 발현 카세트를 도입한 형질전환 균주를 개발하고, 상기 균주의 회분배양 및 유가배양 조건의 최적화를 통해 대규모 발효조에서 LK8 유전자를 저비용으로 대량 발현시키고, 효율적인 정제공정을 통해 대량의 LK8 단백질의 제조가 가능하므로, LK8 단백질의 신생혈관생성 저해제로의 상용화에 크게 기여할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

프로모터, 분비서열, 서열번호 1로 기재되는 LK8 cDNA 및 터미네이터의 순서로 이루어진 LK8 발현 카세트, 숙주균주의 염색체에 LK8 발현 카세트를 다중으로 삽입하기 위한 δ 염기서열 및 다중삽입 후 선별을 위한 네오마이신 저항유전자 (neo)를 포함하는 M δ LK8 재조합 발현벡터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 프로모터는 GAL1 프로모터이고, 분비서열은 서열번호 2로 기재되는 α -인자 분비신호 (α -factor secretion signal)이고, 터미네이터는 CYC1 터미네이터인 것을 특징으로 하는 벡터.

【청구항 3】

제 1항의 벡터를 숙주 균주에 도입한 형질전환 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 숙주 균주는 사카로마이세스 세레비지애 BJ3501, 사카로마이세스 세레비지애 BY4742, 사카로마이세스 세레비지애 CEN.PK2-1D, 사카로마이세스

스 세레비지에 2805로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 균주.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 숙주 균주는 사카로마이세스 세레비지에 BJ3501인 것을 특징으로 하는 균주 (수탁번호 KCTC 10582BP).

【청구항 6】

(1) LK8 유전자 재조합 발현벡터를 숙주 균주에 도입하여 형질전환 균주를 제조하는 단계;

(2) 단계 1의 형질전환 균주를 종배양한 뒤, 공기 공급량 및/또는 교반속도의 조절로 용존산소량을 일정하게 유지하고, 탄소원으로 포도당 및 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 회분배양하는 단계;

(3) 단계 2의 배양액을 탄소원으로 갈락토스를 포함하는 액체배지에서 유가배양하는 단계; 및

(4) 단계 3의 배양액으로부터 LK8 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 LK8 단백질의 대량 생산방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 단계 1의 형질전환 균주는 제 3항의 형질전환 사카로마 이세스 세레비지에 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 단계 2의 회분배양은 1 ~ 3 vvm (5 내지 80 L/min)의 공기 공급량 및/또는 200 내지 1000 rpm의 교반속도에서 최대용존산소량의 40 ~ 90 %의 용존산소량을 유지하고, 탄소원으로 1 ~ 5% (w/v)의 포도당 및 1 ~ 5% (w/v)의 갈락토스를 포함하는 액체배지를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 6항에 있어서, 상기 단계 3의 유가배양은 최대 용존산소량의 40 ~ 90%의 용존산소량을 유지하고, 탄소원으로 20 ~ 50% (w/v)의 갈락토스를 포함하는 액체배지를 사용하고, 배지내의 잔존 갈락토스 농도가 0.5 ~ 5% (w/v)가 되도록 액체배지의 공급속도를 조절하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 6항에 있어서, 상기 단계 4의 LK8 단백질의 정제는 크로마토그래피 방법으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 크로마토그래피 방법은 이온교환 크로마토그래피 및 소수성 결합 크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography) 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

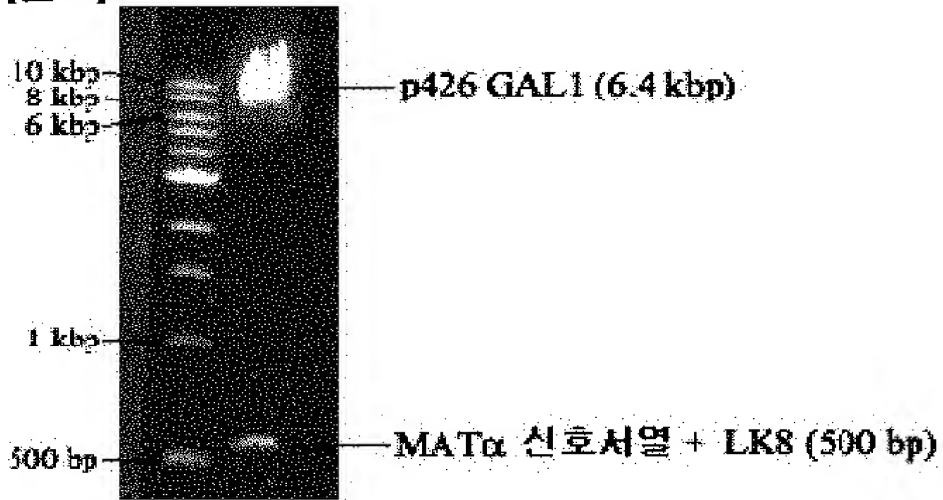
제 11항에 있어서, 상기 이온교환 크로마토그래피는 양이온교환 크로마토그래피이고, pH 4.0 ~ 8.0 및 0 ~ 5 M NaCl를 포함하는 용출액으로 LK8 단백질을 용출시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 11항에 있어서, 상기 소수성 결합 크로마토그래피는 0.1 ~ 5 M의 암모늄설페이트 (ammonium sulfate) 및 0 ~ 500 mM의 NaCl을 포함하는 pH 4 ~ 8, 0 ~ 100 mM의 인산나트륨 용출액으로 LK8 단백질을 용출시키는 것을 특징으로 하는 방법.

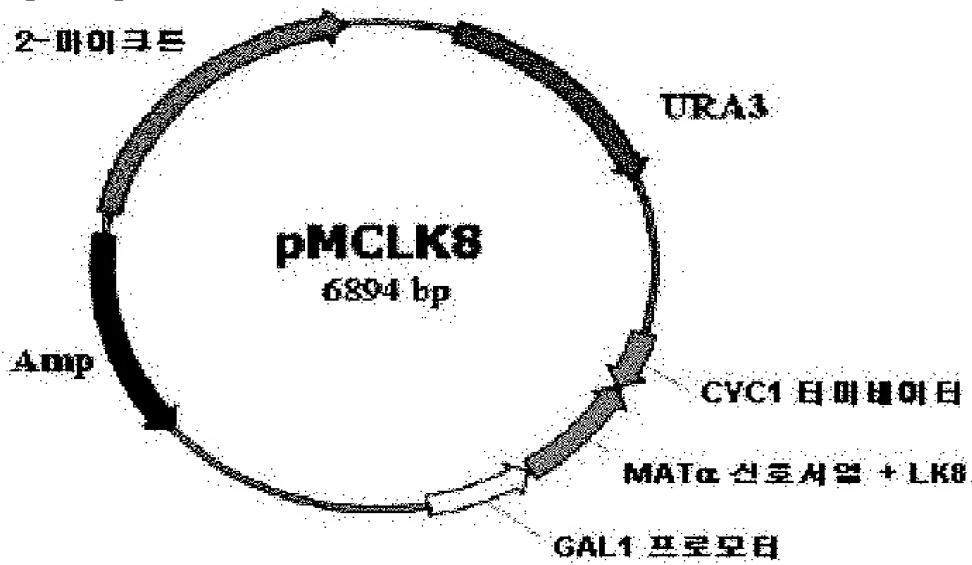
【도면】

【도 1】

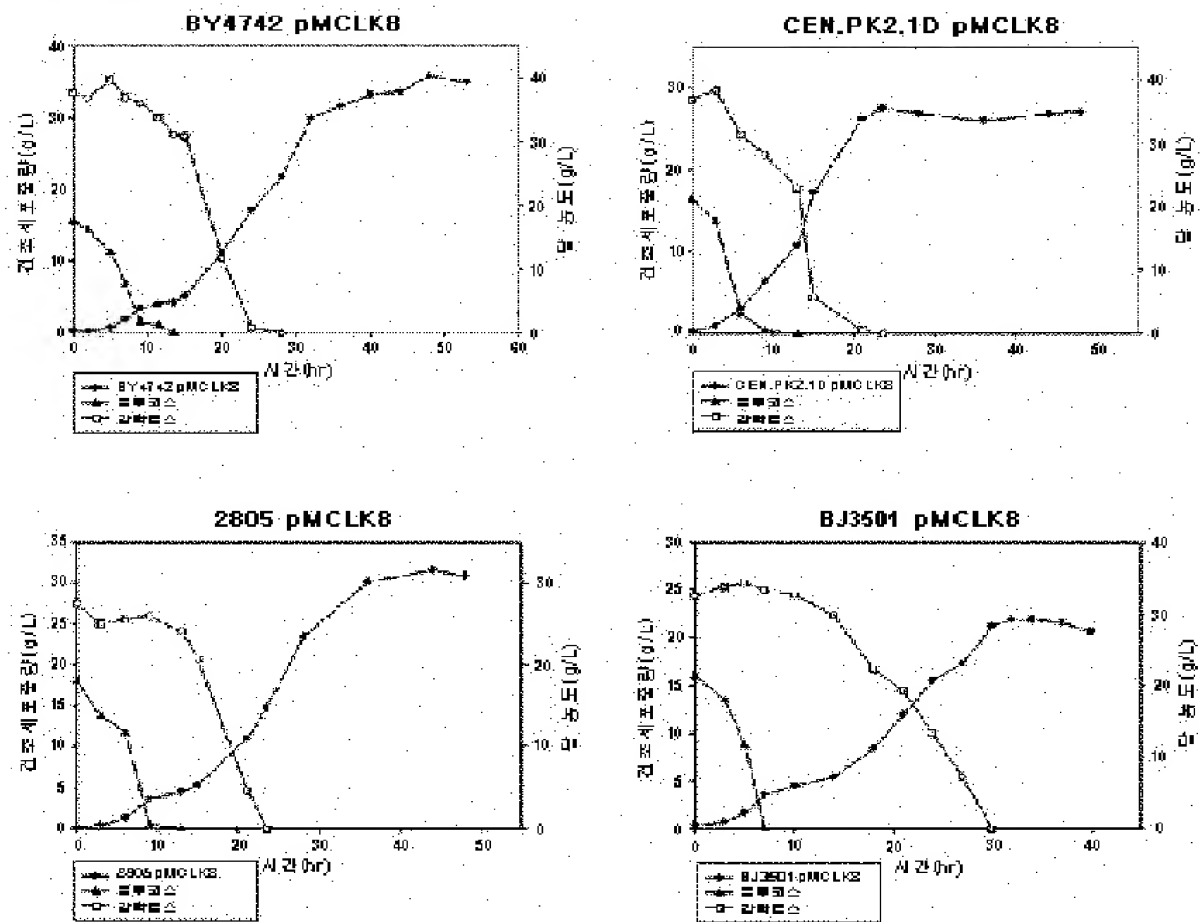


【도 2】

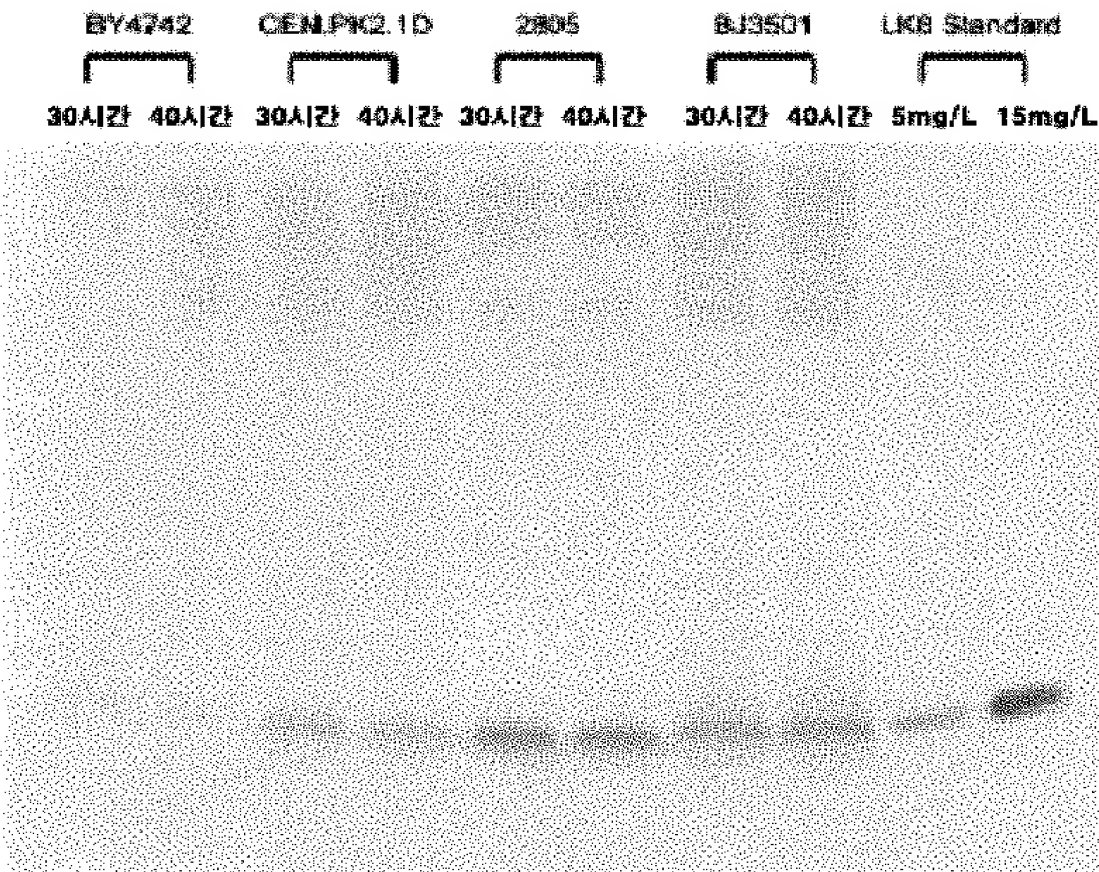
2-마이크론



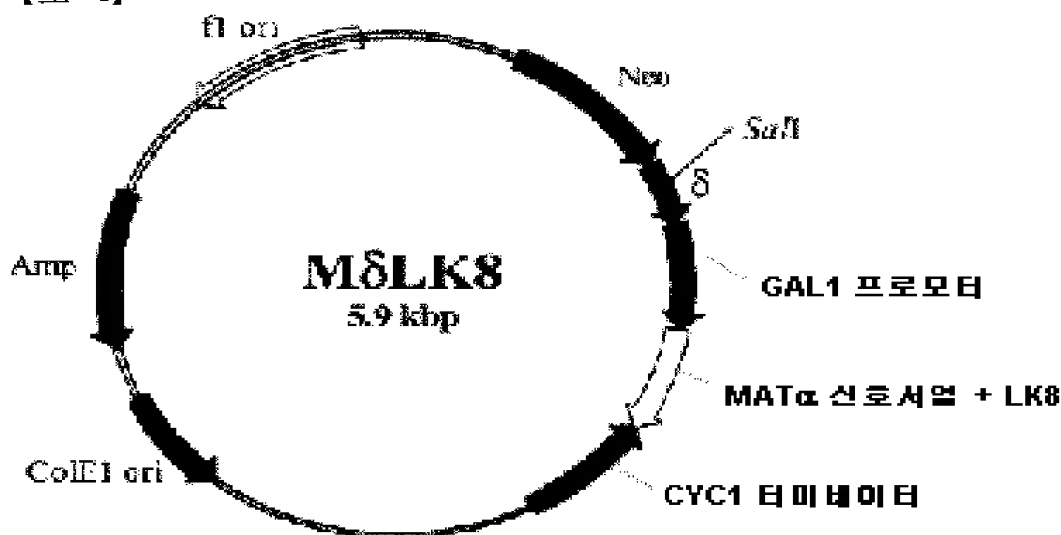
【도 3a】



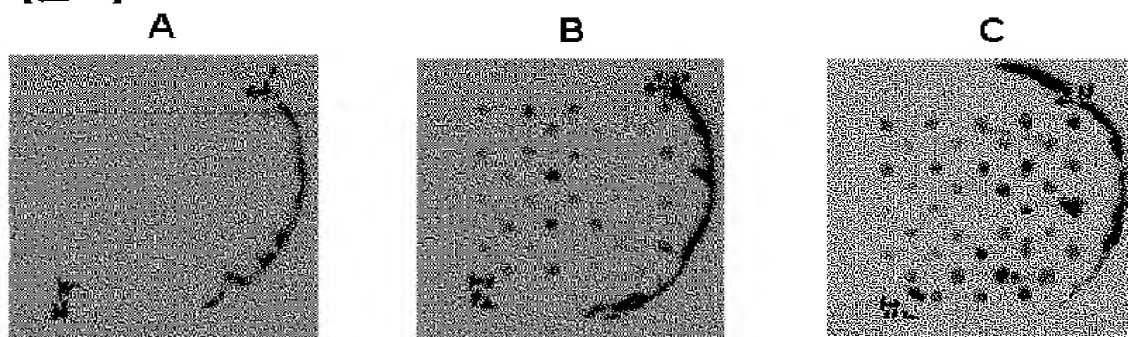
【도 3b】



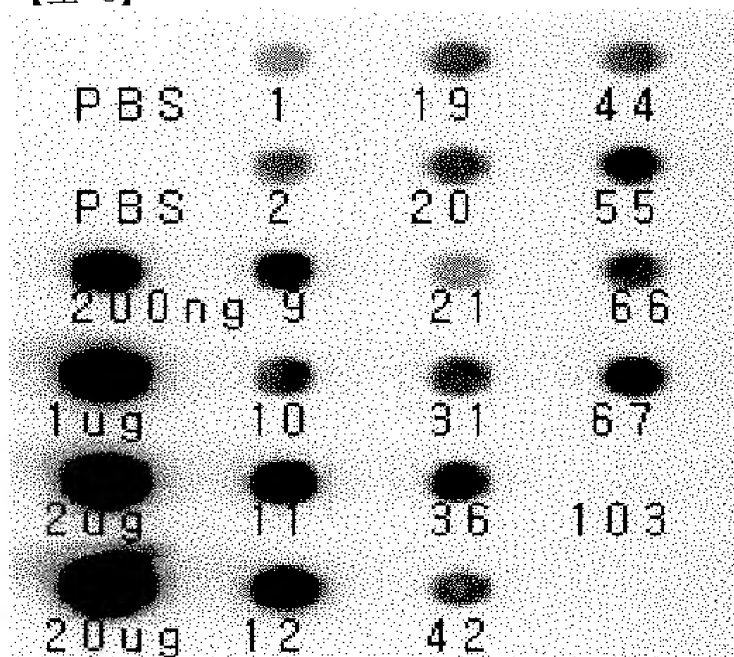
【도 4】



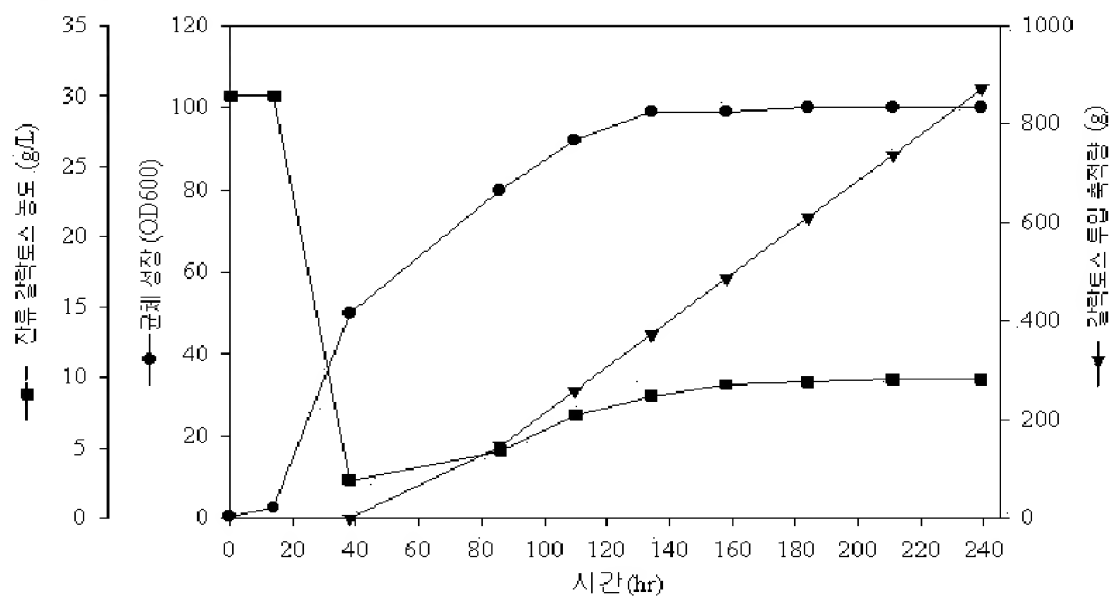
【도 5】



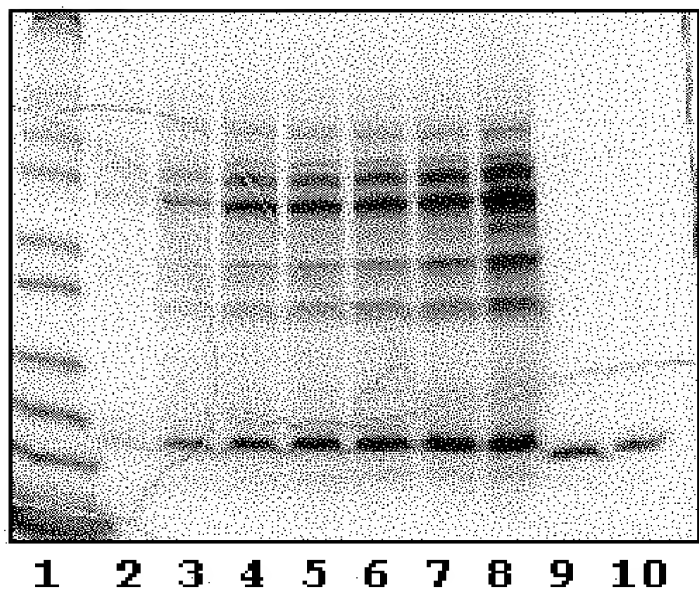
【도 6】



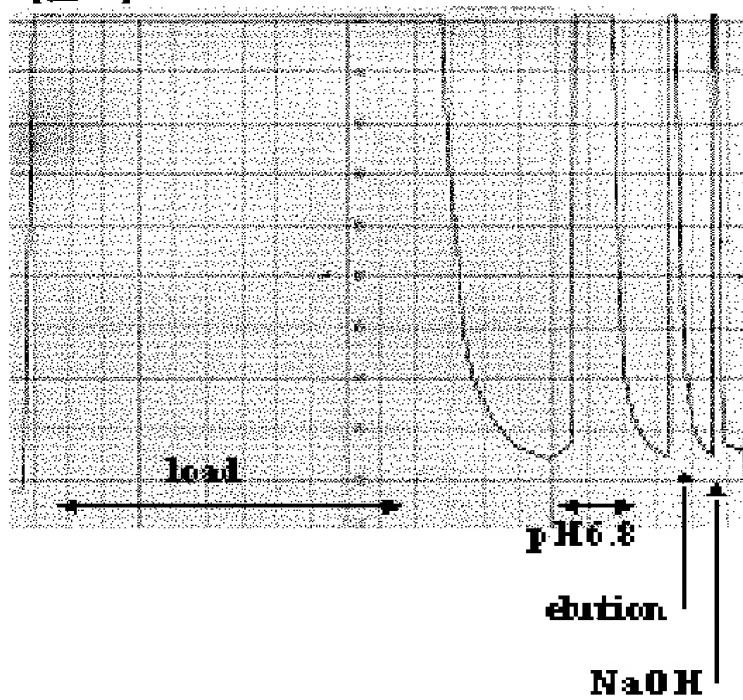
【도 7】



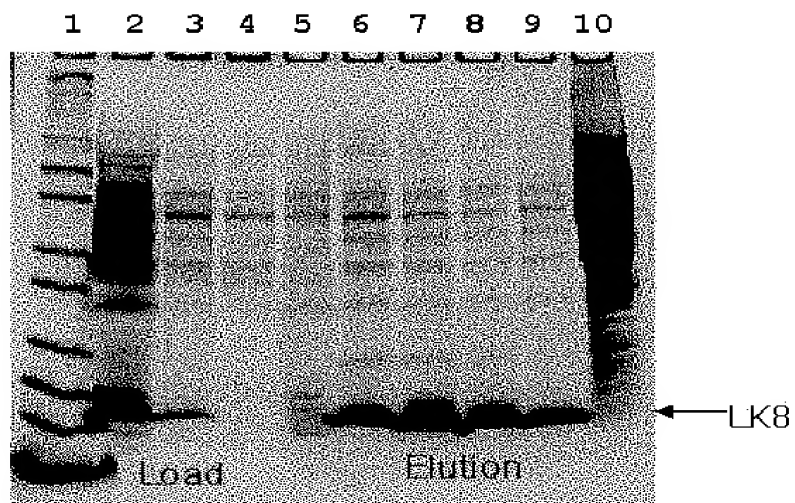
【도 8】



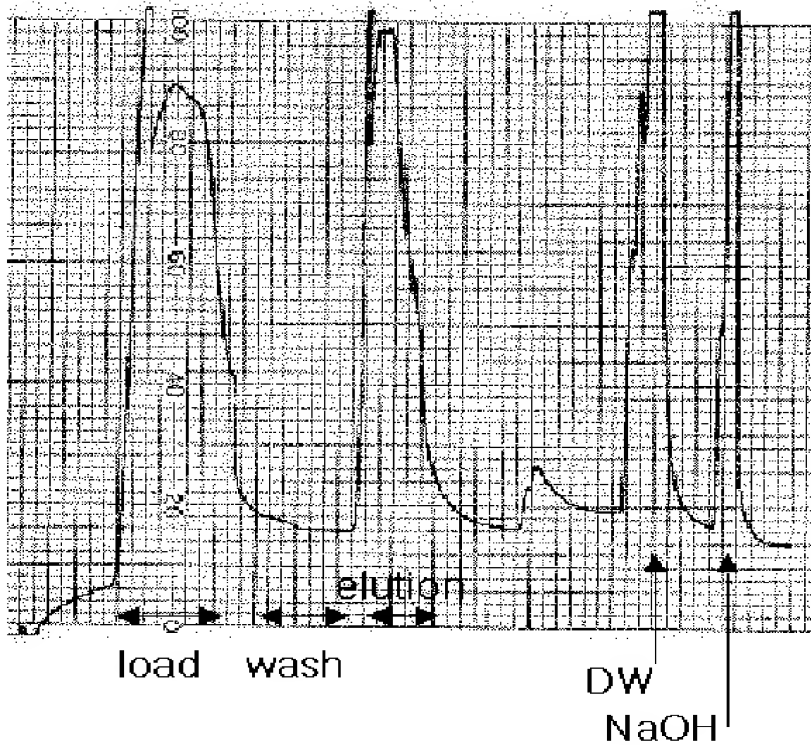
【도 9】



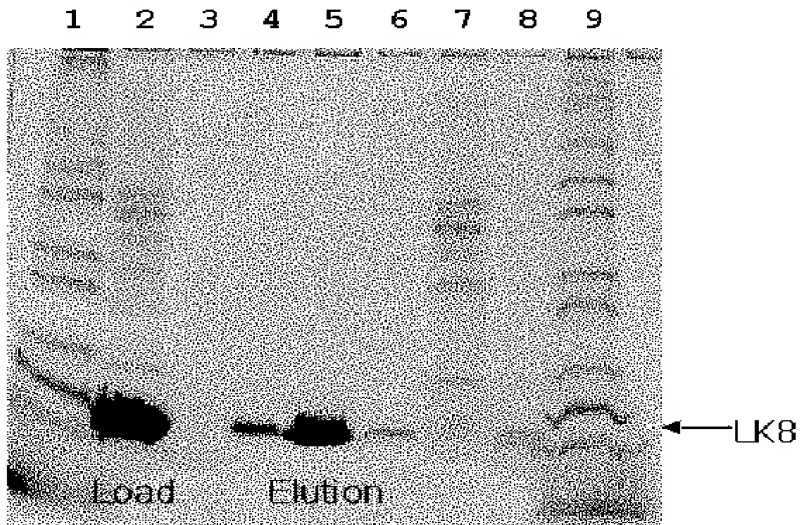
【도 10】



【도 11】



【도 12】



【서열목록】

<110> MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE <120> Transformed *Saccharomyces cerevisiae* and
production method of LK8 protein using the same <130> 3p-10-10 <160> 2 <170>

KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 258 <212> DNA <213> Homo sapiens <220> <221> gene
 <222> (1)..(258) <223> LK8 cDNA <400> 1 gaacaggact gcatgtttgg gaatgggaaa ggataccggg
 gcaagaaggc aaccactgtt 60 actgggacgc catgccagga atgggctgcc caggagcccc atagacacag
 cacgttcatt 120 ccagggacaa ataaatgggc aggtcttgga aaaaattact gccgtaacct tgatggtgac
 180 atcaatggtc cctgggtgcta cacaatgaat ccaagaaaac tttttgacta ctgtgatata 240 cctctctgtg
 catcctct 258 <210> 2 <211> 255 <212>
 DNA <213> Pichia pastoris <220> <221> sig_peptide <222> (1)..(255) <223>
 alpha-factor secretion signal <400> 2 atgagatttc cttcaatddd tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc
 attagctgct 60 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc
 120 tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgtttttgc catdttccaa cagcacaat 180 aacgggttat
 tgttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240 tctctcgaga aaaga
 255